

# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias  
División de Ciencias Biológicas y Ambientales



## INCORPORACION DE TIMIDINA TRITADA EN LINFOCITOS DE RATONES BALB/C INFECTADOS CON HISTOPLASMA CAPSULATUM

Tesis Profesional  
que para obtener el título de  
Licenciado en Biología  
Presenta:

**Rosa Eugenia Cañedo Parra**

Guadalajara, Jalisco marzo 1996

*Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias*  
*División de Ciencias Biológicas y Ambientales*  
*Biología*

0424/95

C. ROSA EUGENIA CAÑEDO PARRA  
P R E S E N T E . -

Manifestamos a usted, que con esta fecha ha sido aprobado el tema de tesis "INCORPORACION DE TIMIDINA MARCADA EN LINFOCITOS DE RATONES BALB/c INFECTADOS CON HISTOPLASMA CAPSULATUM" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicha tesis el M.en C. Alfonso E. Islas Rodríguez.

C. U. C. B. A.



DIV. DE CS.  
BIOLOGICAS Y  
AMBIENTALES

A T E N T A M E N T E  
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas Zapopan, Jal. 2 de Marzo de 1995

EL DIRECTOR

*Fernando Alfaro Bustamante*

DR. FERNANDO ALFARO BUSTAMANTE

EL SECRETARIO

*Gullermo Barba Calvillo*  
BIOL. GUILLEMO BARBA CALVILLO

c.c.p.- El M.en C. Alfonso E. Islas Rodríguez , Director de Tesis.-pte.

c.c.p.- El expediente del alumno

FAB/GBC/cglr.

C.  
DIRECTOR DE LA DIVISION DE  
CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES  
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA  
P R E S E N T E . -

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted,  
que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó el (la) pasante:

CAÑEDO PARRA ROSA EUGENIA  
con el título: Incorporación de timidina tritiada en linfocitos  
de ratones BALB/c infectados con Histoplasma capsulatum.

consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su  
consideración el escrito final para autorización de impresión y en su caso -  
programación de fecha de exámenes de tesis y profesional respectivos.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención -  
que se sirva dar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un --  
cordial saludo.

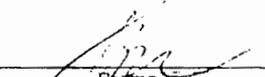
A T E N T A M E N T E  
Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., a 26 de Enero de 1996

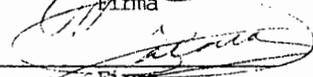
EL DIRECTOR DE TESIS

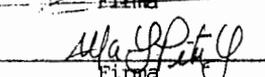
  
M.C. ALFONSO E. ISLAS RODRIGUEZ  
NOMBRE Y FIRMA

SINODALES

- 1.- DRA. GALINA ZAITSEVA PETROVNA  
Nombre completo
- 2.- Esp. OSWALDO PALACIOS RIVERA  
Nombre completo
- 3.- MARIA LUISA PITA LOPEZ  
Nombre completo

  
Firma

  
Firma

  
Firma

## RESUMEN.

La histoplasmosis es una enfermedad de la cual su sintomatología se conoce en México desde la época colonial. Esta enfermedad se encuentra distribuida en toda la república mexicana y presenta una alta frecuencia y mortalidad.

La histoplasmosis es una enfermedad infecciosa, no contagiosa, que es adquirida por inhalar las esporas del hongo Histoplasma capsulatum. Esta manera de ser adquirida hace que afecte en primer lugar al pulmón, pudiendo ser confundida con la tuberculosis por los síntomas que presenta (fiebre, tos, cefalea, disnea, dolor pleurítico), además las lesiones pulmonares son del mismo tipo que las que se presentan en la tuberculosis. La histoplasmosis presenta cuatro formas anatómo-clínicas; histoplasmosis primaria, histoplasmosis aguda diseminada, histoplasmosis crónica e histoplasmosis cicatrizal.

El Histoplasma capsulatum es un hongo dimórfico que cuando está libre se encuentra en fase micelial y al entrar al huésped toma la fase de levadura, es un parásito intracelular específico de los macrófagos y provoca una inmunodeficiencia que hace al huésped incapaz de defenderse contra la infección.

Para poder estudiar la histoplasmosis es necesario utilizar modelos de experimentación en animales, ya que cambian favorablemente las escalas de tiempo y espacio. Las analogías

as entre otras especies y el organismo humano son en muchas ocasiones suficientemente abundantes para justificar el estudio de fenómenos biológicos y la extrapolación que se hace de los resultados en ellas obtenidos.

Este trabajo es un modelo murino de histoplasmosis diseminada en el cual se utilizaron ratones BALB/c infectados -- con levaduras de Histoplasma capsulatum para estudiar la incorporación de timidina tritiada por los linfocitos del bazo de éstos ratones infectados. Los linfocitos fueron estimulados con Concanavalina A (Con A) y con histoplasmina. La capacidad de los linfocitos en cultivo, provenientes de los ratones infectados con Histoplasma capsulatum para incorporar timidina, al ser estimulados con Con A, estuvo deprimida desde la primera hasta la tercera semana de los experimentos, pero después de la quinta semana, los valores de incorporación fueron normales o tuvieron un ligero incremento. La incorporación de timidina en los linfocitos estimulados con histoplasmina, estuvo deprimida durante las siete semanas del experimento, recuperándose después.

## INDICE

1. ANTECEDENTES.	Pag.
1.1 La histoplasmosis en México.....	1
1.2 Aspectos patológicos de la histoplasmosis.....	2
1.3 Agente causal de la histoplasmosis.....	5
1.4 Generalidades de la respuesta inmune.....	6
1.5 Respuesta inmune en la histoplasmosis.....	13
1.6 Modelos.....	15
2. JUSTIFICACION.....	17
3. OBJETIVOS.....	19
4. HIPOTESIS.....	20
5. METODOLOGIA.....	21
6. RESULTADOS. ....	24
7. DISCUSION.....	27
8. BIBLIOGRAFIA.....	34

## ANTECEDENTES.

### 1.1 La histoplasmosis en México.

América es el continente donde existe el mayor número de casos de micosis como: histoplasmosis, candidiasis, blastomycosis, esporotricosis, etc. La mayoría de los pacientes pertenecen a grupos socioeconómicos bajos de las áreas rurales (17).

Respecto a la histoplasmosis en México se carece de cifras confiables desde el punto de vista epidemiológico. A pesar de lo anterior y considerando que las condiciones ecológicas de nuestro país favorecen las infecciones por Histoplasma capsulatum y debido a que la sintomatología de la infección primaria se conoce desde la época colonial, dada su frecuencia y alta mortalidad, es posible inferir la importancia de esta enfermedad en México (17). Existen tres factores que han hecho singulares las epidemias de histoplasmosis en México: la frecuencia, la gravedad y la distribución (13,14, 15). La aparición de una enfermedad grave que atacaba simultáneamente a grupos de sujetos que entraban a minas, cuevas y diversos tipos de lugares confinados, y de los cuales muchos morían, se explica por la presencia de Histoplasma capsulatum en estos sitios, lo cual ha sido demostrado en la actualidad. En México prácticamente todas las epidemias se han visto asociadas con el guano de murciélago, presentándose

se sobre todo en trabajadores que penetraban en cuevas para sacar este producto que se usa como fertilizante (11,13,14, 15). Las epidemias mexicanas de histoplasmosis se presentan en las más diversas regiones y latitudes del país, contrariamente a lo que sucede en Estados Unidos, Venezuela y Perú - donde existen zonas endémicas de histoplasmosis que corresponden a regiones definidas (13,14,15,16). En México tanto las epidemias como los casos aislados han ocurrido en Durango, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Nayarit, San Luis Potosí, Querétaro, Guerrero, Veracruz, Yucatán, Colima y Jalisco (13,16).

#### 1.2 Aspectos patológicos de la histoplasmosis.

La histoplasmosis es una enfermedad infecciosa mas no contagiosa producida por el hongo dimórfico Histoplasma capsulatum (8,20,18).

Generalmente esta enfermedad tiene como órgano de choque el pulmón ya que es adquirida por inhalación (7), pero puede extenderse a una micosis generalizada que se difunde por los ganglios linfáticos mediastínicos, bazo, hígado, suprarrenales, tubo digestivo, riñones, corazón y otros órganos (11,13,20).

La mayoría de los casos de histoplasmosis son asintomáticos por lo que pasan desapercibidos, pero gracias a la prueba de sensibilidad cutánea a la histoplasmina (antígeno soluble obtenido del cultivo del hongo), se tiene noción de que es un proceso difundido en casi toda la república mexicana

na (13,16).

La histoplasmosis presenta cuatro formas anatómo-clínicas: histoplasmosis primaria, histoplasmosis aguda diseminada, histoplasmosis crónica e histoplasmosis cicatrizal (8, - 18). La clasificación de Furcolow en relación a la histoplasmosis primaria se ajusta a la realidad mexicana, esta clasificación considera dos tipos: es asintomático y el sintomático, y divide éste último en tres formas clínicas; leve, moderada y grave o epidémica (13).

Histoplasmosis primaria (34). Por lo menos el 90% de todos los contactos respiratorios con Histoplasma capsulatum no se notan o se atribuyen a influenza. Las manifestaciones son: tos, fiebre, cefalea, mialgias, cólicos estomacales y dolor pleurítico. Con la exposición más intensa, puede haber disnea, cianosis, dolor torácico profundo y pericarditis. En ocasiones hay eritema nudoso, eritema multiforme, exantema difuso o artralgias en especial en mujeres blancas. La radiografía de tórax muestra infiltrados por placas; la linfadenopatía hilar es común, en especial en niños. Puede haber formación de cavidades y derrame pleural. Los complejos de Ghon tienden a estar más calcificados que en la tuberculosis. Las lesiones pulmonares multifocales sanan, con calcificaciones difusas "en escopetazo", que erosionan hacia los bronquios y se espectoran luego como broncolitos.

Histoplasmosis pulmonar crónica (34). La multiplicación de Histoplasma capsulatum inhalado en una bula enfitematosa (en forma característica en la parte posterior y en la punta) causa derrame antigénico hacia zonas pulmonares conti-

guas y neumonitis intersticial segmentaria aguda. Los síntomas son: tos, fiebre y malestar. Los microorganismos son escasos, y en el 80% de los casos la enfermedad se corrige en el transcurso de dos o tres meses con necrosis tipo infarto contracción del tejido lesionado y fibrosis residual. Puede haber recurrencias posteriores. En el 20% de los pacientes la infección persistente conduce a una enfermedad cavitaria crónica. Las cavidades de paredes gruesas se amplían por contigüidad al pulmón vecino ("cavidad en marcha") y la diseminación broncogena de su contenido causa neumonitis y fibrosis en zonas pulmonares dependientes. Los pacientes tienen fiebre y tos productiva; en un tercio hay hemoptisis. Los cultivos de esputo son positivos en un 50 a 70%. La enfermedad suele seguir un curso de desmejoría, no tanto por la infección misma como por la pérdida progresiva de pulmón funcional.

Histoplasmosis diseminada (34). Una infección pulmonar clínicamente manifiesta precede a la diseminación en lactantes, pero es menos probable en adultos. La extensión en adultos ocurre después de inmunosupresión, al activarse la enfermedad a partir de una fase de latencia. Los lactantes muestran la peor respuesta del huésped a la infección y el curso es fulminante, la enfermedad en adultos por lo regular es subaguda o crónica. Las manifestaciones clínicas son pérdida de peso, fiebre, debilidad y malestar, hepatosplenomegalia, linfadenopatía y trastorno de la función en médula ósea (anemia, leucopenia y trombocitopenia). Ulceraciones bucofaríngeas

y a menudo asociadas con disfagia o ronquera, son un indicio importante para establecer el diagnóstico. Las ulceraciones del tubo gastrointestinal (en especial frecuentes en la zona ileocecal) se presentan con hemorragia, obstrucción, perforación o malabsorción. La insuficiencia suprarrenal es común y se presenta a veces años después de la erradicación de los hongos. Las radiografías del tórax muestran datos de infección primaria o hematógena. La endocarditis (aórtica, antes que mitral o tricuspídea) se presenta con émbolos a vasos -- sanguíneos de gran calibre. La histoplasmosis en sistema nervioso central provoca cerebritis focal o meningitis crónica difusa con hipoglucorraquia. También se ven involucrados los riñones, próstata y piel, pero la osteomielitis y artritis -- son raras.

### 1.3 Agente causal.

El agente causal de la histoplasmosis es el Histoplasma capsulatum (forma perfecta: Emmonsiiella capsulata), descubierto por Darling en 1909 (7,11,12).

El Histoplasma capsulatum es un hongo facultativo intracelular oportunista (11,12,33) que se extiende linfohematógicamente, lo cual compromete a los sistemas de órganos ricos en fagocitos mononucleares como son el bazo y el hígado (10). Histoplasma capsulatum es un hongo bifásico, que se presenta en fase de micelio en el medio, y en fase de levadura a 37°C y en los huéspedes infectados. El micelio produce macroconidios tuberculados (8 a 16 m) y microconidios de un tamaño --

(2 a 5 m) mas apropiado para la inhalación. Las levaduras - son ovoides (2 a 3x3 a 4 m) y no están encapsuladas, se producen por gemación única a partir de un cuello estrecho, y - son intracelulares en macrófagos. La gran variedad de formas que presenta hacen difícil la identificación (11,12).

El método usual de identificación incluye el siguiente: morfología típica, en particular la presencia de macroconidios tuberculados en la fase micelial de los organismos -- (25°C); la conversión de la fase micelial a 25°C a la fase - de levadura a 37°C; y la prueba del exoantígeno por medio - del ensayo de inmunodifusión de un extracto micelial contra antisuero específico para Histoplasma capsulatum (19).

#### 1.4 Generalidades de la respuesta inmune.

Una definición de la palabra inmunidad debería comprender "todos los mecanismos fisiológicos que permiten al huésped reconocer los antígenos como extraños a su ser, y neutralizarlos, eliminarlos o metabolizarlos, con o sin lesión de los tejidos propios (6,27).

Las respuestas inmunológicas pueden dividirse en: específicas e inespecíficas. En la inmunidad inespecífica el primer contacto con el huésped y una configuración extraña ocasiona una respuesta que consiste en la movilización de células fagocitarias hacia las regiones donde se introdujo la - configuración extraña (antígeno). Puede tratarse de un fenómeno aislado o de un acontecimiento integrado que causa una respuesta inflamatoria. La respuesta inmune específica es la

reacción del huésped frente a una sustancia extraña y no --  
otra; comprende una serie de interacciones celulares que se  
manifiestan por síntesis de productos específicos. La res---  
puesta inmune específica se distingue de las inespecíficas -  
por tres características: su discriminación entre dos antígenos,  
su heterogeneidad y su memoria. La respuesta inmune específica  
depende de dos mecanismos efectores: 1) la intervención de un  
producto soluble de los tejidos linfoides, que se llama anticuerpo  
(inmunidad humoral), y 2) intervención de -  
linfocitos sensibilizados específicamente (inmunidad celular  
o debida a células ) (6,21,27). Hay diversos tipos y mecanismos  
celulares que intervienen en las expresiones y en la regulación  
de las reacciones mediadas por células. Estas células incluyen;  
linfocitos T, macrófagos, células destructoras o asesinas  
(células K), células asesinas naturales (células NK). La  
reacción mediada por células puede dividirse en tres etapas:  
la primaria es la fijación del antígeno a un receptor que  
existe en la superficie del linfocito T sensibilizado. Esto  
puede producirse directamente, o mediado por un antígeno  
unido a un macrófago. Hay cierto número de otras sustancias  
que pueden unirse a la superficie del linfocito T y activarlo,  
como por ejemplo las interleucinas. La segunda etapa de la  
reacción antígeno-linfocito T está formada por las  
manifestaciones in vitro de inmunidad mediada por células,  
y que se descubren indirectamente por fenómenos morfológicos  
y bioquímicos. Los cambios morfológicos de los linfocitos  
en cultivo de tejidos consiste en la transformación en -  
células blasto, seguida por mitosis. Algunos investigadores

sugieren que el macrófago es esencial para que tenga lugar esta reacción, y que las poblaciones celulares privadas de éstas células pueden ser deficientes en cuanto a su capacidad linfoproliferativa. Los acontecimientos bioquímicos se manifiestan por la síntesis de novo de DNA, RNA o proteína descubierta mediante precursores marcados radiactivos. La etapa terciaria son las manifestaciones biológicas in vivo de estos acontecimientos iniciales. Consta de las siguientes fases: la generación de células T supresoras, T ayudadoras o cooperadoras para interacciones de células T-T y T-B; la generación de células citotóxicas y las células T de memoria (6,21,27).

Los linfocitos T nacen en la médula ósea y se diferencian en el timo, las formas maduras contienen marcadores específicos. Al proseguir la diferenciación, estas células dan origen a varias subpoblaciones, cada una de las cuales se limita a una o a unas pocas de las actividades que muestra la población total de células T (6,27).

Células T auxiliares o cooperadoras (Th). las células Th son las encargadas de presentar el antígeno a los linfocitos B para que estos puedan producir anticuerpos, también reaccionan con los macrófagos para recibir al antígeno y activar a las demás células T. A la célula auxiliar humana corresponde 40 a 60% de los linfocitos T en la sangre periférica, y a las células auxiliares del ratón aproximadamente el 30% (5).

Células T supresoras (Ts). Estas células pueden suprimir la función o la diferenciación de las células B o de

otras células T implicadas en la inmunidad celular o en la cooperación con las células B. Probablemente esta supresión ocupa un lugar importante en la regulación fisiológica de las respuestas inmunes, lo mismo que en el control de la autoinmunidad y el rechazo de los injertos y de los tumores (4,5). Todavía no se sabe exactamente como actúan estas células, pero algunas de sus posibles funciones son: 1) interferencia con las interacciones celulares; 2) impedir la identificación del antígeno; 3) inhibir las modificaciones bioquímicas que el antígeno induce a la células B; 4) oponerse a la diferenciación de las células B para dar células productoras de anticuerpos, y 5) inhibir la proliferación de las propias células T. También se ha visto que las células Ts actúan sobre los macrófagos (5).

Células T citotóxicas (Tcx, CTC). La capacidad de células sensibilizadas por un antígeno para atacar y destruir las células blanco es un fenómeno descrito como citotoxicidad mediada por células (CMC) o linfólisis mediada por células (LMC). la subpoblación de Tcx es la base de éste fenómeno. La destrucción de células blanco por Tcx puede diferenciarse de la actividad semejante de otras células por varias características: 1) presenta restricción de antígeno y aparece sólo después de estímulo antigénico; 2) presenta restricción del complejo mayor de histocompatibilidad (CHM), y 3) la muerte suele ser más lenta y por lo general necesita dos o tres días en cultivo para producir citotoxicidad importante. Las células Tcx se ponen en contacto con antígeno primario y con el antígeno de histocompatibilidad como señal de--

Citocinas. (1).

Los procesos inmunológicos son en gran parte mediados por unas proteínas llamadas citocinas. Algunas de ellas son producidas por los fagocitos mononucleares, por lo que se les ha dado el nombre de monocinas, otras son producidas por los linfocitos T y se les llama linfocinas. Los linfocitos T producen varias linfocinas que actúan principalmente en la regulación del crecimiento y diferenciación de varias poblaciones de linfocitos.

Las linfocinas se clasifican en cuatro grupos según su acción principal:

En el primer grupo se encuentran las citocinas que median la inmunidad natural e incluyen el interferón tipo I antiviral, interleucina-1, interleucina-6, y las quimiocinas. El origen celular predominante de estas moléculas son los fagocitos mononucleares.

El segundo grupo de citocinas es derivado en gran parte de la estimulación antigénica de los linfocitos CD4+ T y actúan regulando la activación, crecimiento y diferenciación de células B y T. Este grupo incluye la interleucina-2, que es el principal factor de crecimiento de las células T; interleucina-4; regulador de la síntesis de inmunoglobulina E, y el factor transformador del crecimiento, el cual inhibe la transformación de linfocitos.

El tercer grupo de citocinas, producidas por activación antigénica de linfocitos CD4+T y CD8+T, sirven a la activación de leucocitos en la respuesta inflamatoria, estas células efectoras se encuentran bajo la regulación de células T.

Este grupo incluye el interferón gamma, el principal activador de los fagocitos mononucleares; linfotoxina, un activador de neutrófilos; interleucina-10, un regulador negativo de la función de los fagocitos mononucleares; interleucina-5 un activador de eosinófilos; y la interleucina-12 (producida por los fagocitos mononucleares), un estimulador de células NK y de células T.

Al cuarto grupo se les llama factores estimulantes de las colonias, consisten en citocinas derivadas de células del estroma medular y de células T, los cuales estimulan el crecimiento de los progenitores de médula ósea, los cuales proporcionan una fuente adicional de linfocitos en la respuesta inflamatoria.

De este modo las citocinas sirven a muchas funciones que son críticas en la defensa del huésped contra los agentes patógenos y provee un vínculo entre la inmunidad inespecífica y la inmunidad específica. Las citocinas también regulan la magnitud y la naturaleza de la respuesta inmune, interviniendo en el crecimiento y diferenciación de los linfocitos. Finalmente las citocinas proveen un importante mecanismo de amplificación que capacita pequeños grupos de linfocitos específicos a algún antígeno activando varios mecanismos efectoros para eliminar el antígeno. La excesiva producción o acción de las citocinas puede causar daño y también la muerte de los tejidos propios.

## Mitógenos de células T.

Los mitógenos son sustancias que inducen mitosis, varias proteínas vegetales llamadas fitoaglutininas, porque aglutinan células de mamíferos, o fitohemaglutininas (FHA), si -- aglutinan eritrocitos; estimulan la mitosis de células B, T o ambas, según su especificidad (4,6). La concanavalina A - (Con A) y la FHA son lectinas que activan las células T (4,- 5). La Con A es el mitógeno más específico de células T. La Con A se extrajo inicialmente de un frijol (Concanavalina - ensiformis) en 1919 y se identificó como lectina para eritrocitos en 1935. Solo en 1970 se descubrió que se conjugaba - con los linfocitos. La Con A es una proteína que se presenta sobre todo como tetrámero a pH mayor de 7, y como dímero a - pH menor de 6. La Con A y la succinil Con A son mitógenos po - tentes para linfocitos T y la dosis de 3 microgramos/ml es - óptima (5).

Los mitógenos vegetales son policlonales y resultan es - pecíficos de fragmentos de los fragmentos de azúcar de las - glucoproteínas de superficie, la Con A se fija a las proteín - as que poseen grupos alfa-manosilo (6).

## Transformación linfoblástica.

La transformación blastoide es la proliferación de c<sup>u</sup>lu - las sensibilizadas, que en presencia del antígeno específico, conduce a la formación de blastos (27).

Los linfocitos son capaces de diferenciarse, transfor - marse y reproducirse cuando son estimulados por mitógenos es - pecíficos o por un antígeno al cual han sido sensibilizados.

Esta transformación linfoblástica puede estudiarse in vitro mediante métodos morfológicos e isotópicos que consisten en medir la incorporación de precursores marcados de DNA, RNA o proteínas, cuya síntesis aumenta durante la transformación (5,27). El punto final de reacción se mide por transformación linfoblástica, índice mitótico o incorporación de precursores radiactivos de DNA (Timidina tritiada) o RNA (uridina tritiada) (6). La más usada es la incorporación de timidina tritiada al DNA.

#### 1.5 Respuesta inmune en la histoplasmosis.

El papel de las células mediadoras de la respuesta inmune es muy importante, pero es muy poco lo que se conoce de las perturbaciones inmunorregulatorias, las cuales pueden ser inducidas por histoplasmosis diseminada en individuos sin aparentes defectos de la inmunidad celular antes de empezar la infección. Estos complejos desórdenes de la inmunorregulación ocurridos como consecuencia de la histoplasmosis sistémica son sugeridos por la gran prevalencia de negatividad en la prueba cutánea a la histoplasmina entre pacientes con esta forma de infección y la pobre respuesta blastogénica linfoide a estimulación de antígenos de Histoplasma capsulatum y mitógenos in vitro (2).

Esta evidencia sugiere que la pobre respuesta de linfocitos T sanguíneos a antígenos o mitógenos en algunos casos puede ser causada, en parte por la presencia de subpoblaciones de células T supresoras capaces de disminuir las respuestas efectoras citotóxicas y ayudadoras.

La gama de respuestas del huésped tiene relación directa con la eficacia de los mecanismos de inmunidad mediada - células. Al haber inmunidad óptima, los hongos son poco frecuentes, es adecuada la formación de granulomas, y la enfermedad es de extensión limitada. Con la inmunidad deficiente, los macrófagos, incluidos los que circulan en la sangre, están saturados por levaduras intracelulares, la formación de granulomas es defectuosa y la enfermedad es extensa. Los granulocitos y los factores séricos juegan un papel secundario en las defensas del huésped.

La prueba dérmica de la histoplasmina rara vez es de utilidad diagnóstica, pues los resultados positivos son frecuentes en la zona endémica. A la inversa, la enfermedad diseminada no necesariamente se asocia con un resultado negativo. La cutirreacción positiva también eleva los títulos de anticuerpos séricos. La prueba de fijación del complemento (con antígeno de fase de micelio o de levadura) muestra reacciones cruzadas con la blastomicosis y la coccidioidomicosis. Los títulos bajos de anticuerpos persisten durante años después de la histoplasmosis primaria. El título o el aumento del título a cuatro veces, sugieren pero no prueban, la histoplasmosis activa; tampoco el título negativo descarta la posibilidad de enfermedad. Los títulos no están a la par de la actividad del padecimiento y son de poca utilidad para vigilar el tratamiento o evaluar el pronóstico. Las pruebas de anticuerpo por el método de inmunodifusión producen dos bandas (m,h) de utilidad diagnóstica potencial. Si aparece solo

histoplasmosis temprana, pues la banda m suele preceder a la banda h. La prueba de aglutinación de látex con partículas de látex sensibilizada con histoplasmina es una ayuda útil en el diagnóstico de histoplasmosis aguda, en especial a títulos 1:16. Pueden ocurrir resultados positivos o negativos falsos, y se requiere de pruebas diagnósticas de confirmación (34).

#### 1.6 Modelos.

Los eventos naturales son casi siempre demasiado complejos para que podamos comprenderlos y estudiarlos en todos sus aspectos. Abstractamos o singularizamos determinadas variables del proceso para su estudio. Al hacer esta abstracción hacemos desde el principio, un modelo idealizado del objeto o evento de estudio, es decir, es decir estamos sustituyendo la parte del universo que estamos estudiando, por un modelo de estructura similar, pero más sencillo. Esto significa - que los hechos científicos son modelos de los reales (26).

El modelo es una formulación que imita un fenómeno del mundo real y por medio del cual podemos efectuar predicciones (29). Hay en la ciencia diversas categorías de modelos del universo que difieren en su grado de abstracción (26). En su forma más sencilla, los modelos pueden ser verbales o gráficos, les siguen los modelos materiales o reales y luego los teóricos o formales. (29).

Un modelo es una representación de un sistema real, por otro distinto que se supone tiene algunas propiedades semejantes a las que se desean estudiar en el sistema original.

En general gran parte de la fisiología humana está basada en experimentos realizados en otros órdenes de mamíferos. La experimentación en el hombre, por razones obvias, es difícil o imposible de realizar en muchos casos. Las analogías entre otros órdenes de mamíferos y el organismo humano, son en muchas ocasiones, suficientemente abundantes, para justificar el estudio de los fenómenos biológicos y la extrapolación que se hace de los resultados en ellas obtenidos (26). Un modelo material puede algunas veces, cambiar favorablemente las escalas del tiempo o del espacio. Por ejemplo, el empleo de animales pequeños para el estudio de la fisiología de animales grandes. Como ejemplo de un modelo que modifica la escala del tiempo, podemos citar el empleo de ratas o bacterias para los estudios de genética, en vez de recurrir a especies con un ciclo de vida y de reproducción más prolongados. Sin embargo, un modelo material será necesariamente un modelo parcial, semejante al original en algunos aspectos, pero necesariamente distinto en algunos otros (26,29).

## 2. Justificación.

La infección de ratones de Histoplasma capsulatum proporciona un modelo altamente uniforme y reproducible que se resuelve sin intervención terapéutica (2,3,25). Proporciona un excelente instrumento para investigar la respuesta inmunoregulatoria durante la fase activa y la fase de restablecimiento de una infección sistémica por hongos.

El uso de ratones singénicos es especialmente valioso en esta observación, porque ordinariamente, las subpoblaciones de células que median estas respuestas pueden ser identificadas y estudiadas así como la función específica con gran precisión (3). Aunque los ratones pueden ser usados extensamente como un modelo experimental de histoplasmosis, casi todos los investigadores tienen directamente su atención en la patogenicidad de varias cepas de Histoplasma capsulatum y la susceptibilidad relativa de animales a la infección determinada por diferencias en especies o cepas, edad y estado de inmunización.

Un modelo murino no letal de histoplasmosis fue desarrollado por Artz y Bullock (2,3), y otro por Khöler, Blair y colaboradores (25).

En el modelo desarrollado por Khöler los ratones fueron infectados con  $4 \times 10^7$  levaduras de Histoplasma capsulatum por inoculación endotraqueal, se utilizaron los tejidos de -

bazo, sangre y pulmón para cultivo y cuantificación de antígeno (25).

El estudio de métodos inmunocitoquímicos muestran que el bazo de ratones infectados intravenosamente por Histoplasma capsulatum es infiltrado por gran cantidad de macrófagos. Las células CD4+T y CD8+T son difundidas y esparcidas por todo el bazo (33).

Para estudiar los mecanismos de inmunorregulación en histoplasmosis sistémica, Artz y Bullock establecieron un modelo de infección altamente reproducible en ratones C3H/anf inoculados por vía intravenosa con levaduras de Histoplasma capsulatum de la cepa G217-B que produce una infección diseminada que se resuelve en un periodo de 8 semanas sin intervención terapéutica (2,3).

En este trabajo se va a reproducir este modelo de infección pero ahora inoculando a ratones BALB/c con levaduras de Histoplasma capsulatum de la cepa MIA con el objeto de establecer si el modelo de Artz y Bullock es válido en ratones BALB/c y por lo tanto pueda ser usado en nuevas investigaciones en ratones más accesibles.

### 3. Objetivos.

- 1.- Establecer un modelo de histoplasmosis en ratones BALB/c.
- 2.- Estudiar la inmunodeficiencia del ratón infectado por medio de la incorporación de timidina tritiada en linfocitos de bazo estimulados con Concanavalina A e histoplasmina de ratones infectados con levaduras de Histoplasma capsulatum.

#### 4. Hipótesis.

El Histoplasma capsulatum altera algunas funciones del linfocito T del ratón y disminuye su capacidad de proliferación por lo que los linfocitos de bazo de ratones BALB/c infectados con Histoplasma capsulatum incorporan menor cantidad de timidina tritiada que los linfocitos de bazo de ratones no infectados.

## 5. Metodología.

### Animales:

Ratones machos BALB/c de 4 semanas de edad al iniciar el experimento, proporcionados por el bioterio del Centro de Investigaciones Biomédicas de Occidente (CIBO) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

### Levaduras de Histoplasma Capsulatum:

Levaduras de la cepa MIA de Histoplasma Capsulatum se obtuvieron inoculando a los ratones por vía intraperitoneal con 0.5 ml del hongo en fase micelial en solución salina isotónica. Después de dos semanas de la inoculación se sacrifican los ratones, se remueve el bazo y se siembra en agar sangre enriquecido con cisteína hasta que crecen las levaduras, después se resiembran en medio de cultivo líquido RPMI 1640 (Sigma) suplementado y 24 horas después se inocula a los ratones para iniciar el modelo de infección (3,32).

### Infección de los ratones:

Las levaduras en medio líquido se ajustan a  $4 \times 10^6$  - levaduras por mililitro y a cada ratón se le inculan 0.05ml. por vía intravenosa en la vena de la cola.

Mitógenos:

Concanavalina A (Sigma) a una dosis de 2 microgramos - por mililitro.

Histoplasmina a una dosis de 1 microgramo por mililitro proporcionada por el Instituto Nacional de Salud.

Medio de cultivo:

Medio de cultivo líquido RPMI 1640 (Sigma) suplementado con; 1% de L-glutamina, 1% de penicilina-estreptomicina, 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de piruvato, 5% de suero fetal de ternera y 36 microlitros de mercapto-etanol. La preparación del medio de cultivo se hizo en campana de flujo laminar, en condiciones de extrema esterilidad (22,23).

Obtención de linfocitos:

Los ratones se sacrifican por dislocación cervical en las semanas 1, 3, 5 y 7 después de la inoculación intravenosa de levaduras de Histoplasma capsulatum, se les extrae el bazo por cirugía en condiciones asépticas y luego se prepara una suspensión de células del bazo homogeneizándolo con dos agujas para insulina (25x16 5/8') en solución salina balanceada de Hank's (HBSS), se deja sedimentar en hielo durante cinco minutos, después se remueve el sobrenadante y se lava dos veces en HBSS durante 10 minutos a 1250 rpm y se prepara una concentración final de  $5 \times 10^6$  células por mililitro en el medio de cultivo (9).

#### Cultivo de linfocitos:

Las células ajustadas a una concentración de  $5 \times 10^6$  células por mililitro se siembran en cajas de microcultivo de 96 pozos. En cada pozo se siembran  $5 \times 10^5$  células en 0.1 mililitros de medio de cultivo, luego se adiciona por triplicado 0.1 mililitros del mismo medio a los pozos de control y a los experimentales 0.1 mililitros de Concanavalina A (tanto de ratones infectados como sanos). Se incuban durante 72 horas a  $37^\circ\text{C}$  en una atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$ , 95% de aire y 85% de humedad. A las 48 horas de iniciado el cultivo se les añaden un microcurie de timidina marcada con tritio y 24 horas después se cosechan manualmente en papel filtro (un papel para cada pozo) (22,23,32); una vez secos se lavan dos veces en ácido tricloroacético frío durante 5 minutos cada vez, con agitación constante; posteriormente se lavan dos veces en alcohol absoluto frío durante 5 minutos cada vez, con agitación constante. Una vez secos los papeles filtro se colocan cada uno en un vial y se les agrega 3 mililitros de líquido de centelleo y se miden las cuentas por minuto (cpm) en un contador de centelleo líquido para radiaciones beta (9,32).

El cultivo de linfocitos se prepara en campana de flujo laminar en condiciones de extrema esterilidad.

## 6. Resultados.

Efecto de la infección con levaduras de Histoplasma capsulatum en la incorporación de timidina tritiada.

Los linfocitos estimulados con Con A de los ratones infectados con levaduras de Histoplasma capsulatum estuvieron inhibidos en la semana 1 (56921  $\pm$ 7325 cpm). En la semana 3 la incorporación estuvo más deprimida (8562  $\pm$ 2231) comparado con sus controles (96916  $\pm$ 8475). En la semana 5 los linfocitos de ratones infectados tuvieron una respuesta normal (106850  $\pm$ 3139 cpm) y en la semana 7 los linfocitos de ratones infectados mostraron una incorporación de timidina tritiada más alta que el grupo de ratones normales (115736  $\pm$ 3920 vs 100940  $\pm$ 4497 cpm). Por otra parte los linfocitos de ratones infectados que fueron estimulados con el antígeno específico histoplasmina, tuvieron una incorporación de timidina tritiada más baja durante la siete semanas del experimento; la incorporación normal de timidina tritiada fué recuperada en la semana 18.

Tabla 1. Efecto de la infección con levaduras de Histoplasma capsulatum en la incorporación de timidina tritiada por linfocitos de bazo de ratones BALB/c estimulados con Con A.

Semana <sup>a</sup>	Grupo <sup>b</sup> (cpm)	Medio <sup>c</sup> (cpm)	Con A (2 mcgr/ml)
1	Normal	3311+151	108087+9372
	Infectado	6927+1623	56921+
3	Normal	1418+ 59	96916+8475
	Infectado	1802+293	8562+ 2131
5	Normal	3031+257	108800+4473
	Infectado	868+50	106850+3139
7	Normal	2901+90	100404+4497
	Infectado	1118+68	115736+3840

<sup>a</sup> Tiempo transcurrido después de la inoculación de Histoplasma capsulatum por vía intravenosa a ratones BALB/c.

<sup>b</sup> En cada grupo se realizaron tres experimentos.

<sup>c</sup> Medio de cultivo líquido RPMI1640 suplementado.

Tabla 2. Efecto de la infección con levaduras de Histoplasma capsulatum en la incorporación de timidina tritiada por linfocitos de bazo de ratones BALB/c estimulados con histoplasmina.

Semana <sup>a</sup>	Grupo <sup>b</sup> (cpm)	Medio <sup>c</sup> (cpm)	Histoplasmina (1 mcgr/ml)
1	Normal	3311±151	4972± 411
	infectado	6927± 1623	4115± 1222
3	Normal	1418± 59	1604± 71
	infectado	1802± 293	1604±141
5	Normal	3031±257	2971±411
	infectado	369±50	913±243
7	Normal	2901±90	3607±298
	infectado	1118±68	2094±683
18	infectado	3633±230	9856±331

<sup>a</sup> Tiempo transcurrido después de la inoculación de Histoplasma capsulatum por vía intravenosa a ratones BALB/c.

<sup>b</sup> En cada grupo se realizaron tres experimentos.

<sup>c</sup> Medio de cultivo líquido RPMI 1640 suplementado.

## 7. Discusión.

Los mecanismos precisos por los cuales Histoplasma capsulatum resulta patogénico para el hombre son desconocidos, sin embargo, se ha visto que en sujetos con histoplasmosis - progresiva con diseminación, se presenta una falla en la respuesta inmune celular. Esto pudo ser demostrado con la disminución en la capacidad de responder al estímulo de mitógeno y antígeno de los linfocitos de bazo de ratones infectados - con levaduras de Histoplasma capsulatum.

En este estudio se mostró que los niveles de proliferación de linfocitos T estimulados con Con A estuvieron deprimidos desde la semana 1 de la infección, y la depresión máxima se observó en la semana 3. Entre las semanas 5 y 7 los niveles de proliferación de las células T recuperaron sus valores normales. Por otra parte, los linfocitos de ratones infectados estimulados con histoplasmina, recuperaron su nivel normal de reproducción después de un periodo de 18 semanas. El tiempo promedio para que los linfocitos T estimulados con Con A recobren la reproducción normal es de 5 a 7 semanas. Esto puede ser el resultado de un mecanismo de inmunomodulación inducido por los determinantes antigénicos presentes en las levaduras de Histoplasma capsulatum, el cual produce una supresión de las células T, permitiendo así al parásito evadir la respuesta inmune.

Los bajos niveles de proliferación de los linfocitos de ratones infectados pueden observarse en la deficiente incorporación de timidina tritiada con respecto a los valores mostrados por los linfocitos de ratones sanos, ya que al haber reproducción es necesaria la incorporación de timidina presente en el medio de cultivo para la formación de las cadenas complementarias de DNA para las nuevas células.

La falta de respuesta al mitógeno y antígeno puede ser explicada por una baja en la producción de IL-2, ya que la cantidad de IL-2 es importante para la efectividad de la respuesta inmune celular, por ser ella la encargada de llevar a cabo el ciclo celular desde la fase G1 hasta la fase S en las células involucradas en la respuesta inmune celular.

Esta insuficiente producción de IL-2 puede deberse a que el Histoplasma capsulatum produzca una sustancia que:

- 1) inhiba la producción de IL-2; 2) tenga la capacidad de bloquear los receptores de superficie específicos para IL-2 en los linfocitos T; 3) bloquee la síntesis de DNA en los linfocitos T; 4) inactive total o parcialmente a los linfocitos T cooperadores; 5) active los linfocitos T supresores.

La supresión en la respuesta inmune celular la podemos observar tanto en la respuesta negativa a la reacción cutánea a la histoplasmina en paciente con histoplasmosis diseminada, que puede deberse a que no se producen las células T y las interleucinas necesarias para la respuesta inflamatoria, como también en el tiempo que necesitan los linfocitos en cultivo para recuperar los valores normales de proliferación

al ser estimulados con histoplasmina, lo cual indica que las células reconocen a los determinantes antigénicos de Histoplasma capsulatum como supresores de la respuesta inmune celular.

Esta inmunosupresión es probable que empiece desde el primer contacto de los macrófagos con el hongo. Siendo este hongo un parásito intracelular específico de los macrófagos, es posible que altere las funciones de éstos para así protegerse de la respuesta inmune del huésped. Normalmente cuando un macrófago tiene contacto con un antígeno activa a los linfocitos T cooperadores y a las células NK produciendo varias interleucinas.

El linfocito T cooperador al recibir la señal de activación enviada por el macrófago, empieza la producción de Il-2 para acelerar la reproducción de las demás células que intervienen en la respuesta inmune celular, en tanto que las células NK aumentan grandemente su actividad citolítica.

Pero si en vez de que el macrófago active la respuesta inmune celular al ser invadido por el Histoplasma capsulatum, cesa sus funciones parcial o totalmente, y además presenta a los determinantes antigénicos del hongo como señal supresora del sistema inmune, esto pudiera ser una explicación de que los linfocitos en cultivo, al ser estimulados con histoplasmina, tardan tanto tiempo en recuperar su proliferación normal, ya que esto sucede cuando los ratones han logrado un total restablecimiento de la infección, y por lo tanto, los linfocitos T ya no reconocen a los determinantes antigénicos del Histoplasma capsulatum como supresores de la respuesta

immune.

## 8. Bibliografía.

1. Abbas Abul K, Lichtman Andrew H, Pober Jordan S. 1994. Celular and Molecular Immunology. Editorial Saunders. Segunda edición .USA.
2. Artz RP, Bullock WE. 1979. Immunoregulatory responses in experimental disseminated histoplasmosis: depression of T cell dependent and T effector responses by activation of splenic supressor cells. *Infec Immun.* 23:893-902.
3. Artz RP, Bullock WE. 1979. Immunoregulatory responses in experimental disseminated histoplasmosis: lymphoid organ histopathology and serological studies. *Infec Immun.* 23:884-892.
4. Bach JF. 1984. Inmunología. Editorial Limusa. México, DF.
5. Barret JT. 1985. Inmunología, Inmunoquímica e inmunobiología. Nueva Editorial Interamericana. México. DF.
6. Bellanti JA. 1981. Introducción al estudio de la inmunología. Nueva Editorial Interamericana. México. DF.
7. Bryan CS, Schneiderman H. 1992. Disseminated histoplasmosis (What's your diagnosis?). *Consultant.* 10(32):80-81.
8. Carrión Calderón M. 1980. Histoplasmosis. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas.* Cuenca, Ecuador. 14(1):10-16
9. Deepe GS, Watson S, Bullock WE. 1982. Generation of disparate immunoregulatory factors in two inbred strains

- of mice with disseminated histoplasmosis. J Immunol. 129:2186-2129.
10. Deepe GS Jr. 1994. Role of CD8+ T cells in host resistance to systemic infection with Histoplasma capsulatum in mice. J Immunol. 152(7):3491-34500.
  11. Dulbecco, Davis, Eisen, Ginsberg, Wood. 1978. Tratado de microbiología. Salvat Editores. Barcelona, España.
  12. Freeman BA. 1983. Tratado de microbiología de Burrows. Nueva Editorial Interamericana. México, DF.
  13. González Ochoa A, Cervantes Ochoa A. 1960. Histoplasmosis epidémica y su prevención. Rev Inst Salubr Enferm Trop. 20:129-145.
  14. González Ochoa A. 1983. Epidemiología de la histoplasmosis primaria en México. Rev Inst Salubr Enferm Trop. 23:64-126.
  15. González Ochoa A. 1964. Realizaciones de la investigación científica en México para la salud pública: Histoplasmosis. Gaceta Médica de México. 94:981-986.
  16. González Ochoa A, Félix D. 1970. Distribución geográfica de reactividad cutánea a la histoplasmina en México. Revista de investigación en salud pública. 31:74-77.
  17. González Ochoa A. 1981. Panorama de las micosis en México. Rev Salud Pública de México. Epoca V. Vol XXIII. No 3
  18. Goodwin RA. 1980. Disseminated histoplasmosis clinical and pathologic correlations. Medicina. 59:1-32.
  19. Hall GS, Pratt-Rippin K, Washington A. 1992. Evaluation

- of a chemiluminiscent probe assay for identification of Histoplasma capsulatum isolates. J of Clinical Microbiology 30(11):3003-3004.
20. Hay-RJ. 1993. Histoplasmosis. Semin-Dermatol. 12(4):310-314.
  21. Hercowitz HB. 1981. Inmunofisiología: Papel de la célula e interacciones celulares. Nueva Editorial Interamericana. México, DF.
  22. Hoffenbach A, Lagrange PH, Bach MA. 1983. Deficit of --- interleukin-2 production associated with impaired T-cell proliferative responses in Mycobacterium lepraemurium infection. Infect Immun. 39:109-116.
  23. Hoffenbach A, Lagrange PH, Bach MA. 1984. Influence of dose and route of Mycobacterium lepraemurium inoculation on the production of interleukin-1 and interleukin-2 in C57BL/6 mice. Infect Immun. 44:665-671.
  24. Jawetz Ernest. 1981. Microbiología Médica. Editorial EL manual moderno. México, DF.
  25. Kholer S, Blair R, Schnzlein, Bick C, Fojtasek M. 1994. Clearance of Histoplasma capsulatum variety capsulatum antigen is useful for monitoring treatment of experimental histoplasmosis. J. Lab. Anal. 8(1):1-3.
  26. Odum EP. 1972. Ecología. Nueva editorial Interamericana. México, DF.
  27. Ortiz Ortiz Librado, Zambrano Villa Sergio. 1983. Inmunología. Editorial Universidad de Guadalajara. Guadalajara Jalisco, México.

28. Pila Pérez Rafael. 1980. Histoplasmosis. Rev Cub Med -- Trop. 32:63-71.
29. Rosenblueth Arturo. 1971. El método científico. Centro de Investigación y Estudios Avanzados. Instituto Politécnico Nacional. SEP. México, DF.
30. Ríos Fabra A, Moreno AR, Isturiz RE. 1994. Fungal infection in Latin America Countries. Infect Dis Clin North Am 8(1):1-3.
31. Velasco Cstrejón O, González Ochoa A. 1977. Primary pulmonary epidemic histoplasmosis in an abandoned mine. Mykosen. 20(10): 393-399.
32. Watson SR, Schmitt SK, Hendricks DE, Bullock WE. 1985. Immunoregulation in experimental disseminated murine histoplasmosis disturbances in the production in the interleukin-1 and 2. J Immun. 131:3487-3493.
33. Wu-Hsieh-BA. 1993. Resistance mechanism in the murine experimental histoplasmosis. Arch Med Res. 24(3):233-238.
34. Wyngaarden JB, Smith LH. 1985. Tratado de medicina interna de Cecil. Editorial Interamericana. Vol II. 1772-1773.